

1-6)。根系发达,根的生长很快,15 d后长达 8~ 10 cm。三裂叶野葛再生植株经锻炼后,在移栽基质中的移栽成活率达 90% 以上。

有关三裂叶野葛叶柄和茎段的组织培养和植株再生的研究目前尚未见正式报道。我们的结果表明,三裂叶野葛叶柄的组织培养和植株再生效果比其茎段更好。比较野葛不同外植体再生植株的效果,我们认为野葛组培快繁材料以选取叶柄最合适。本文结

果为我们利用细胞工程技术来生产葛根的药用有效成分提供了基础材料。

参 考 文 献

1 郭建平,周全,孙其荣. 中草药, 1995, 27(3): 163

2 石昌顺. 中草药, 1994, 25(4): 496

3 范礼理,赵德化,赵敏崎,等. 药学报, 1985, 20(9): 647

4 Takaya K, Itokawa H. Chem Pharm Bull, 1982, 30(4): 1496

5 施和平,潘瑞炽. 植物生理学通讯, 1998, 34(6): 444

(1999-05-13收稿)

用同工酶技术鉴定滇产菟丝子

云南农业大学农学院(昆明 650201) 郭凤根*

南京农业大学农学系 李扬汉

摘 要 采用过氧化物酶同工酶和谷草转氨酶同工酶分析技术鉴定了产于云南的 3种 7份菟丝子材料,结果表明用同工酶技术鉴定菟丝子是一种新的行之有效的方法。

关键词 过氧化物酶同工酶 谷草转氨酶同工酶 菟丝子鉴定

Identification of *Cuscuta* L. by Isozyme Analysis

College of Agronomy, Yunnan Agricultural University (Kunming 650201) Guo Fenggen

Department of Agronomy, Nanjing Agricultural University Li Yanghan

Abstract 7 samples of 3 species of Yunnan dodders were identified by peroxidase isozyme and glutamic oxalacetate transaminase isozyme analysis. The results showed that isozyme analysis was a new and effective method to identify these dodders.

Key words peroxidase isozyme isozyme of glutamic oxalacetate transaminase dodder identification

菟丝子 *Cuscuta* spp. 是一类重要的中草药资源,具有补肝肾、益精、明目、安胎等功效^[1]。关于菟丝子种类的鉴定,已报道过花粉形态^[2]、种子表面超微结构^[3]、种皮显微特征^[4]、薄层层析^[5]、紫外光谱法^[6]和蛋白质纸上电泳^[7]等方法或技术,但用同工酶技术鉴定菟丝子尚未见报道。作者进行了用同工酶技术鉴定菟丝子的尝试,效果很好。现将结果作一报道。

1 材料与方 法

1.1 材料及其处理:从云南各地收集到 3种 7份菟丝子种子(表 1),用浓硫酸处理 20~ 30 min以打破休眠,用清水漂洗干净后把种子置于垫有潮湿滤纸的培养皿中,于 25℃生化培养箱中培养,每天光照

12 h。约 3 d后待菟丝子茎尖从种皮中伸出时取幼苗制样。

表 1 供试菟丝子材料

编号	中名	拉丁学名	产地
1	菟 丝 子	<i>Cuscuta chinensis</i> Lam.	云南省宾川县
2	金 灯 藤	<i>C. japonica</i> Choisy	云南省景洪市
3	大花菟丝子	<i>C. reflexa</i> Rox b.	云南省玉溪市
4	大花菟丝子	<i>C. reflexa</i> Rox b.	云南省大理市
5	大花菟丝子	<i>C. reflexa</i> Rox b.	云南省昆明市
6	大花菟丝子	<i>C. reflexa</i> Rox b.	云南省呈贡县
7	大花菟丝子	<i>C. reflexa</i> Rox b.	云南省路南县

1.2 聚丙烯酰胺凝胶的制备:按胡能书等介绍的方法^[8]制备聚丙烯酰胺凝胶,规格为 13.5 cm× 23.5 cm× 0.1 cm,每板 12个点样槽,浓缩胶浓度 4%,分离胶浓度因酶而异:过氧化物酶同工酶(POD) 7

* Address: Guo Fenggen, Agricultural College of Yunnan Agricultural University, Kunming

郭凤根 男,1964年 6月生于浙江平湖。1998年 7月从南京农业大学农学系植物学专业毕业,并获理学博士学位。1996年 11月起任云南农业大学农学院副教授。主要从事资源植物学的教学和科研工作。曾主持或参与了 8项国家自然科学基金课题或省部级科研课题的研究工作,在各级学术刊物上发表学术论文 30篇,许多论文被《Agri》、《Weed Abstracts》、《Biocontrol News and Information》、《Chemical Abstracts》、《中国生物学文摘》和《中国农业文摘》等中外检索刊物收录。

% ; 谷草转氨酶同工酶 (GOT) 6%。

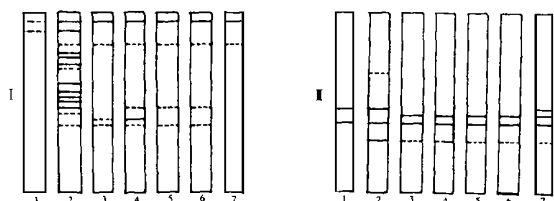
1.3 酶液的制备: 取菟丝子幼苗 0.5 g, 放入蒸馏水中冲洗, 滤纸吸干后放入预冷的小研钵中, 加 10 滴 1% β -巯基乙醇和 10 滴浓电极缓冲液, 冰浴研磨匀浆, 10 000 r/min 离心 10 min 后取上清液作酶液备用。

1.4 点样、电泳和染色: 用 50 μ L 微量进样器吸取酶液点在样品槽内, 每槽 1 个样品; 点完样吸取电极缓冲液缓缓加在样品上至点样槽满, 然后再加电极缓冲液使电路接通, 以溴酚蓝作指示剂, 用稳压稳流电泳仪稳流电泳, 浓缩胶时每槽 1 mA, 到分离胶时加大电流至每槽 2 mA, 约需 5 h 后当溴酚蓝移至离玻板下端 1 cm 处时停止电泳。POD 染色液配方是 5 mL 联苯胺贮存液 + 2 mL 3% H_2O_2 + 93 mL 蒸馏水, 室温下染色 5 min; GOT 染色液配方是吡哆醛-5'-磷酸盐 2 mg + α -酮戊二酸 200 mg + L-天冬氨酸 400 mg + 坚牢蓝 BB 600 mg + 0.2 mol/L Tris-HCL 缓冲液 (pH 8.0) 100 mL, 凝胶在染色液中于 37 $^{\circ}$ C 下恒温染色 10 min^[9,10]。

1.5 电泳结果的记录和保存: 将染完色的同工酶凝胶用 7% 醋酸进行漂洗和固定; 测定酶带迁移距离和指示剂迁移距离, 两者相除即得相对迁移率 (Rf 值); 拍摄凝胶照片, 绘制酶谱示意图; 制干胶片供永久保存。

2 结果与分析

2.1 过氧化物酶同工酶 (POD): 7 份菟丝子试材的过氧化物酶同工酶的电泳酶谱见图 1-I, 共有 15 条 POD 酶带, 其中 Rf 值为 0.059 的第一条酶带为所有试材所共有, 是菟丝子的特征带。菟丝子 POD 酶带根据迁移率的大小可分为慢带区 (Rf 值 < 0.15)、中间带区 (0.15~0.4) 和快带区 (0.4~0.7) 3 个区域。菟丝子 (No. 1) 仅有 2 条酶带, 均位于慢带区; 金灯藤 (No. 2) 有 14 条酶带, 分布在 3 个区中; 大花菟丝子 (No. 3~7) 有 2~5 条酶带, 分布在 3 个区中, 其中 Rf 值为 0.196 的酶带为大花菟丝子的共有带。



I 过氧化物酶同工酶酶谱 II 谷草转氨酶同工酶酶谱

图 1 电泳酶谱

2.2 谷草转氨酶同工酶 (GOT): 7 份菟丝子试材的谷草转氨酶同工酶电泳酶谱见图 1-II, 它们共有 5 条酶带, Rf 值为 0.61 的酶带是菟丝子 GOT 的特征带。菟丝子 (No. 1) 具有 Rf 值为 0.54 和 0.61 的 2 条酶带; 金灯藤 (No. 2) 有 4 条酶带, Rf 值分别为 0.34, 0.54, 0.61 和 0.71; 5 份大花菟丝子中有 4 份的酶谱完全相同, 都有 2 条强带和 1 条弱带, 仅云南产大花菟丝子除具有这 3 条酶带外还具有 Rf 值为 0.54 的强带。

3 讨论

3.1 菟丝子等小粒菟丝子的种子一般都很小, 用种子来鉴定难度很大; 金灯藤和大花菟丝子等大粒菟丝子的种子虽然较大, 但两者极为相似, 用显微方法较难区分。黄建中等^[3]提出了应用扫描电镜观察菟丝子种子表面超微结构, 并依据超微结构进行检疫、鉴定的新方法, 该法效果很好, 但由于电镜设备非一般单位所具有, 测试价格也比较高, 所以其应用受到了一定的限制。作者以产于云南省的 3 种菟丝子的 7 份种子为试材, 先让其萌发生成幼苗, 制样分析了过氧化物酶同工酶和谷草转氨酶同工酶 2 种酶系统, 酶带分离效果好, 重复性也好, 而且设备简单, 操作方便, 分析技术也都比较成熟, 可作为菟丝子鉴定的新方法加以应用。

3.2 菟丝子分种检索表

3.2.1 过氧化物酶同工酶分种检索表

1. 有 1 条 Rf 值为 0.108 的酶带。
 2. 仅有 2 条酶带 菟丝子
 2. 酶带数多, 9~14 条 金灯藤
1. 不具 Rf 值为 0.108 的酶带 大花菟丝子

3.2.2 谷草转氨酶同工酶分种检索表

1. 有 1 条 Rf 值为 0.34 的酶带 金灯藤
1. 不具有 Rf 值为 0.34 的酶带。
 2. 仅有 2 条酶带 菟丝子
 2. 有 3 条或 4 条酶带 大花菟丝子

参考文献

- 1 金 晓, 李家实, 阎文玫. 中国中药杂志, 1992, 17(5): 292
- 2 张芝玉, 郭 澄, 苏中武, 等. 广西植物, 1991, 11(4): 308
- 3 黄建中, 李扬汉, 章毓英. 植物分类学报, 1993, 31(3): 261
- 4 金 晓, 李家实, 阎文玫. 中国中药杂志, 1990, 15(4): 9
- 5 郭 澄, 苏中武, 李承祜, 等. 基层中药杂志, 1992, 6(3): 12
- 6 郭 澄, 苏中武, 李承祜. 中草药, 1991, 22(12): 553
- 7 张淑华, 李连怀, 常广敬, 等. 河北医学院学报, 1988, 9(4): 169
- 8 胡能书, 万贤国编. 同工酶技术及其应用. 长沙: 湖南科技出版社, 1985: 1
- 9 沈全光. 植物生理学通讯, 1980(4): 59
- 10 黄庆榴. 植物生理学实验手册. 上海: 上海科技出版社, 1985: 344